

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
14 de Julio de 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2005/063287 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: **A61K 39/39**

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2004/000017

(22) Fecha de presentación internacional:  
28 de Diciembre de 2004 (28.12.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
2003-0312  
30 de Diciembre de 2003 (30.12.2003) CU

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **INSTITUTO FINLAY. CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE SUEROS Y VACUNAS** [CU/CU]; Avenida 27 # 19805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana 11600 (CU). **UNIVERSIDAD DE CAMBRIDGE, FACULTAD PARA LAS CIENCIAS VETERINARIAS** [GB/GB]; Madingley Road, Cambridge, CB3 0ES. United Kingdom, Cambridgeshire (GB).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **PÉREZ MARTÍN, Oliver Germán** [CU/CU]; Calle 66, # 913 e/ 9 y 1, Playa, Ciudad de La Habana 11300 (CU). **LASTRE GONZÁLEZ, Miriam de San Juan Bosco** [CU/CU]; Calle 66 # 913 e/ 9 y 11, Playa, Ciudad de La Habana 11300 (CU). **RODRÍGUEZ RAMÍREZ,**

**Tamara** [CU/CU]; Calle Céspedes # 110 e/ Calixto García y Benito Anido, Regla, Ciudad de La Habana 11200 (CU). **BRACHO GRANADO, Gustavo Rafael** [CU/CU]; Calle 124 # 2509 e/ 25 y 27, Marianao, Ciudad de la Habana 11500 (CU). **MASTROENI, Pietro** [IT/GB]; 8, St Peter's Road Cotton, Cambridge Cambridgeshire (GB). **DEL CAMPO ALONSO, Judith Mónica** [CU/CU]; Calle 23 # 508 apartamento 3B e/ G y H, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana 10400 (CU).

(74) Mandatario: **VÁZQUEZ D'ALVARÉ, Dánice**; Calle 1ra equina a 10 # 1001, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PROTEOLIPOSOMES AND DERIVATIVES THEREOF AS CYTOTOXIC RESPONSE-INDUCING ADJUVANTS AND RESULTING FORMULATIONS

(54) Título: PROTEOLIPOSOMAS Y SUS DERIVADOS COMO ADYUVANTES INDUCTORES DE RESPUESTA CITOTÓXICA Y LAS FORMULACIONES RESULTANTES

(57) Abstract: The invention relates to the field of vaccine compositions for the effective treatment or prevention of fungal, viral, protozoan or bacterial (preferably intracellular) infections and cancer. The technical objective of the invention is to obtain adjuvants for use in prophylactic or therapeutic vaccines using bacterial proteoliposomes and derivatives thereof, which, when applied together with antigens that are inserted in, conjugated to or mixed with same, induce a cytotoxic T-lymphocyte response to the aforementioned antigen. In this way, the invention can be used to obtain multiple formulations of proteoliposome or the derivatives thereof with heterologous antigens, which, when applied by parenteral or mucosal (preferably nasal) routes, induce cytotoxic responses. Said novel use of proteoliposomes and the derivatives thereof and the resulting antigen formulations can be used to produce novel vaccines in the pharmaceutical industry.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el campo de las composiciones vacunales para el tratamiento efectivo o prevención de infecciones fúngicas, virales, protozoarias o bacterianas (preferiblemente intracelulares) y cáncer. El objetivo técnico que se persigue es obtener adyuvantes para uso en vacunas profilácticas o terapéuticas utilizando Proteoliposomas bacterianos y derivados de estos, que al ser aplicadas junto a antígenos insertados en su estructura, conjugados o mezclados a estos induzcan una respuesta de linfocitos T citotóxica contra dicho antígeno. De esta forma se obtienen formulaciones múltiples del Proteoliposoma o sus derivados con antígenos heterólogos, que al ser aplicados por vía parenteral o mucosal (preferentemente nasal) inducen respuestas citotóxicas. Este nuevo uso de los Proteoliposomas y sus derivados y las formulaciones antigénicas resultantes son aplicables a la obtención de nuevas vacunas en la industria farmacéutica.

WO 2005/063287 A1



PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional*

# PROTEOLIPOSOMAS Y SUS DERIVADOS COMO ADYUVANTES INDUCTORES DE RESPUESTA CITOTOXICA Y LAS FORMULACIONES RESULTANTES

## MEMORIA DESCRIPTIVA

5

La presente invención se relaciona con el campo de las vacunas y su uso en medicina. Más particularmente, ésta se relaciona con el empleo de adyuvantes y las formulaciones vacunales resultantes.

El objetivo técnico que se persigue es favorecer el incremento en la respuesta inmune frente a  
10 antígenos fúngicos, virales, protozoarios, bacterianos o cancerígenos, especialmente aumentar la inducción de respuesta T citotóxica esencial contra estos antígenos. Este trabajo conducirá al desarrollo de formulaciones vacunales terapéuticas o profilácticas.

En este sentido se plantea el uso de Proteoliposomas y sus derivados como adyuvantes en formulaciones con antígenos fúngicos, virales, bacterianos, protozoarios o cancerígenos,  
15 insertados en su estructura, conjugados o mezclados con éstos. Estas formulaciones extenderían la respuesta preferencial T auxiliadora de tipo 1 (Th1) inducida por los Proteoliposomas y sus derivados a los antígenos incluidos (Pérez O *et al.* Infect Immun. 2001, 69(7):4502–4508), induciendo una respuesta de linfocitos T citotóxica (CTL) contra dichos antígenos al ser aplicados por vía mucosal, parenteral o la combinación de éstas.

## 20 ESTADO DEL ARTE

Las infecciones por hongos, virus, bacterias o protozoos intracelulares causan patologías frecuentes en todo el mundo. Las enfermedades cancerosas son también, un terrible azote de la humanidad. Estas infecciones y el cáncer de células humanas implican la producción de gran cantidad de antígenos en el citosol celular, muchos de los cuales son acarreados hacia la  
25 superficie celular asociados a moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I (Heemels, M.-T. and H. Ploegh, 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. Annu. Rev. Biochem. 64,463-491; Rock, K.L. 1996. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. Immunol. Today 17, 131-137; Jondal, M., R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1996. MHC class I restricted CTL  
30 responses to exogenous antigens. Immunity 5:295-302; and Reimann, J. and S. H. E.

Kaufmann. 1997. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. Curr. Opin. Immunol. 9:462-469)

La respuesta inmune fue subdividida fenotípicamente en celular (Th1) y humoral (Th2). Los patrones Th1/Th2 se distinguen primeramente por el patrón de citoquinas que secretan los linfocitos T CD4<sup>+</sup>: fundamentalmente, IFN $\gamma$  e IL12 por las Th1 e IL4 e IL5 por las Th2 (Mossman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cells clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357). Por otra parte, también es posible valorar el tipo de respuesta inducida determinando los perfiles de clases y subclases de inmunoglobulinas séricas característicos de cada tipo de respuesta. Así, en ratones el patrón Th1 induce preferentemente anticuerpos de la subclase IgG2a (dependiente de IFN $\gamma$ ), mientras que el Th2 induce IgE y la subclase IgG1 (dependientes de IL4). En humanos el patrón Th1 cursa con la inducción de subclases IgG1 e IgG3 y el Th2 induce la clase IgE.

Otras citocinas producidas por células no linfoides se han asociado también a estos patrones, como ocurre con la IL12 e IL18 asociada con un patrón Th1. Por otro lado, el IFN $\gamma$  y la IL10 actúan como inhibidores de la respuesta Th2 y Th1, respectivamente.

Hoy en día se ha extendido esta clasificación también a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> los que por semejanza en la producción de citocinas se han clasificado como Tc1 y Tc2. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son los mediadores e inductores fundamentales de actividad CTL. Estos actúan entonces, no sólo como células efectoras, sino también como reguladoras produciendo citocinas que expanden más una respuesta que la otra. Por lo que, la determinación de los subconjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup> presentes en linfoproliferaciones de células mononucleares periféricas de sujetos inmunizados o de órganos linfoides secundarios de animales inmunizados, re-estimulados por un antígeno *in vitro*, es una medida importante de que estas dos poblaciones están siendo estimuladas.

Es necesario eliminar las células infectadas con patógenos intracelulares o las células tumorales. La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) es uno de los mecanismos inmunes más eficientes para ello. Estos reconocen antígenos presentados en el contexto del MHC-I y son capaces de matar las células infectadas a través de la liberación de perforinas, producción de "granzymes" e interacción de los mediadores Fas-FasL (O'Hagan D., Mackicham M., and Singh M. Recent advance in adjuvants for infection disease

Biomolecular Engineering 2001.). La actividad de los CTL es la respuesta inmune más comúnmente aceptada para determinar la efectividad de las vacunas contra las infecciones intracelulares causadas por virus, bacterias o protozoos, así como frente a tumoraciones.

La actividad CTL satisfactoria puede ser determinada por cualquier método conocido, tanto indirectos como directos. Preferiblemente, se combinan los métodos indirectos y directos. En los indirectos, se determina la capacidad del Proteoliposoma o sus derivados, con antígenos insertados en su estructura, conjugados o coadministrados de ser fagocitados, degradados y presentados en la superficie celular asociados a las moléculas MHC-I de líneas celulares. Estos se enfrentan entonces a líneas celulares citotóxicas contra el antígeno insertado y se determina la muerte celular por métodos radioactivos o no radioactivos. Otro índice indirecto es la estimulación, por el Proteoliposoma o sus derivados con antígenos insertados, conjugados o coadministrados, de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en células mononucleares periféricas de humanos inmunizados o provenientes de órganos linfoides secundarios de animales inmunizados, re-estimuladas *in vitro* con el antígeno de interés. La detección de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  e IL2 en células mononucleares re-estimuladas *in vitro* con el antígeno de interés es otro índice indirecto que puede ser determinado por Citometría de Flujo o ELISPOT. En este caso se determina fundamentalmente la producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La producción de IL2 por hibridomas de células T CD8<sup>+</sup> luego del reconocimiento del antígeno específico en el contexto de moléculas MHC-I en la superficie de células presentadoras de antígeno previamente incubadas con el Proteoliposoma o sus derivados conteniendo el antígeno específico insertado en sus estructuras, conjugado o coadministrado con ellos, es otra forma indirecta de evidenciar actividad CTL.

En los directos se inmuniza mamíferos con el Proteoliposoma o sus derivados y los antígenos de interés, insertados en su estructura, conjugados o coadministrados y posteriormente se extraen los órganos linfoides secundarios y se determina la presencia de actividad CTL contra el antígeno de interés asociado a MHC-I. El método más antiguo para detectar actividad CTL antígeno-específica esta basado en el ensayo de citotoxicidad por liberación de cromo radiactivo, el cual ha sido diseñado lo mismo para células frescas (midiendo la actividad efectora CTL) que para líneas CTL (evaluando reactividad CTL de memoria). En ambos casos las células dianas expresan los antígenos específicos de interés, lo cual puede lograrse por varias métodos (infección por virus recombinantes, "peptide loading" o transfección

genética). Más recientemente tienden a utilizarse epítopes CTL específicos previamente determinados.

Otro método *ex vivo* es el ensayo de unión a tetrámeros, “tetrameric-binding assay” (TBA). Los complejos tetraméricos de moléculas MHC-I cargados con epítopes óptimos unen directamente los receptores de células T CD8<sup>+</sup> (TCRs) antígeno-específicas independientemente de su capacidad funcional. Se utilizan generalmente tetrámeros HLA-A2 unidos al epítope CTL de interés. El TBA es más exacto y preciso para reflejar el número de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas movilizadas *in vivo* pero su capacidad para cuantificar células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas funcionales es limitada.

Por mucho tiempo se consideró a los CTL como el principal componente de la respuesta celular. Hoy se sabe que a pesar de que estos son inducidos durante la respuesta Th1, no todas las respuestas Th1 cursan con la inducción de CTL. Por ello, la necesidad de buscar adyuvantes que induzcan, además de un patrón Th1, actividad CTL.

Los adyuvantes son sustancias que potencian la respuesta inmune específica contra un antígeno provocando una inducción más rápida de esta y aumentando su duración (Vogel FR. Dev. Biol. Stand. 1998,92:241-248). Su uso en las formulaciones vacunales permite reducir la cantidad de antígeno necesaria, dirigir la respuesta hacia un patrón deseado y disminuir el número de dosis necesarias.

Entre los sistemas de adyuvantes disponibles que inducen respuesta Th1 se encuentran:

1. MF59 (emulsión de aceite en agua microfluidizada de aceite de escualeno). Podda A, Del Giudice G. Expert Rev Vaccines. 2003 Apr;2(2):197-203.
2. Monofosforil lípido A (MPL<sup>®</sup>), derivado lipopolisacárido proveniente de *Salmonella minnesota*, que contiene 6 ácidos grasos, particularmente el MPL 3-D-O-acetilado (3D-MPL) u otros derivados no tóxicos del lipopolisacárido (LPS) y combinaciones del MPL, preferiblemente el 3D-MPL o derivados no tóxicos del LPS con sales de aluminio.
3. Fracciones inmunoestimulatorias de *Quillaja saponaria*: Quil A, incorporada en complejos inmunoestimulatorios (ISCOM<sup>®</sup>), Complejos de saponinas, colesterol y

fosfolípidos (Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghtan M and Paliard X. J Immunol 2001,166:3589-98).

4. Partículas de polilactil co-glicolidos (Putney SD and Burke PA, Nat BIOTECHNOL. 1998, 16:153-157).
5. MPL y saponina, particularmente Saponina glicósido triterpénico aislada de la corteza del árbol Quillaja saponaria Molina (QS21) y 3D-MPL como es revelado en WO 94/00153.
6. QS21 y colesterol como es revelado en WO 98/33739.
7. QS21, 33D-MPL y tocoferol emulsionados en agua en aceite como se revela en WO 95/17210 y
8. Oligonucleótidos CpG, secuencias de dinucleótidos citocina-guanina con citocinas no metiladas, característica sólo del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano, como es revelado en WO 96/02555.

Los adyuvantes que inducen CTL en la actualidad son escasos entre los que se encuentran el MF59, los Oligonucleótidos CpG, el QS21, el MPL<sup>®</sup>, los ISCOM<sup>®</sup> y cocleatos derivados de lípidos (O'Hagan D., Mackicham M., and Singh M. Recent advance in adjuvants for infection disease. Biomolecular Engineering 2001 and Edelman Robert. The development and use of vaccine adjuvant. Molecular Biothecnology 2002. 21:2, 129-148.).

Los Proteoliposomas se han descrito para la preparación de vacunas profilácticas contra enfermedades infecciosas por Ruegg CL *et al.* (Preparation of proteosome-based vaccines. J Immunological Methods 1990;135:101-109); Lowell *et al.* (Proteosome-Lipoptide Vaccines: Enhancement of Immunity for Malaria CS Peptides. Science 1988;240:800-2) y también como es revelado en US No. 5,597,572. En esta última, el núcleo fundamental es el Proteoliposoma derivado de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, cuya estructura particulada, su contenido de LPS nativos incorporados y no libres, el polisacárido C, su composición lipídica característica y su adsorción en alúmina, están relacionadas con su elevada inmunogenicidad y probada protectogenicidad en humanos.

La vacuna basada en este Proteoliposoma, VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, ha sido aplicada en más de 50 millones de dosis y ha demostrado ser segura, no reactogénica y eficaz para proteger contra *N. meningitidis* serogrupos B y C. Es además, aplicada durante la lactancia de forma segura y efectiva, donde convierte la T-independencia del Polisacárido C en un antígeno T-

dependiente (Pérez O. *et al.* Th1 response induced by the B component of VA-MENGOC-BC™ overcomes the thymus independence of polysaccharide C and primes for memory in toddler. *Biotecnología Aplicada* 2002; 19(1-2):54). Esta vacuna induce un patrón preferencial Th1 caracterizado por la inducción en humanos y animales de linfoproliferación; anticuerpos IgG anti-Proteoliposoma; subclases IgG1 en humanos e IgG2a en ratones; IFN $\gamma$ , IL2 e IL12 en el ámbito de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas, no-inducción de IgE anti-Proteoliposoma ni incrementos en la IgE total y no-producción de IL4, IL5 tanto en el ámbito de ARNm como proteico (Pérez O *et al.* *Infect Immun.* 2001, 69(72001):4502–4508). Los Proteoliposomas y derivados de estos como las VSSP y las Estructuras cocleares, también se han empleado como adyuvantes como es revelado en (US 6,149,921 del 2000) y en (Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. OCPI. 2002-0292 del 27/11/02), respectivamente.

La presente invención tiene como objeto el empleo de los Proteoliposomas bacterianos naturales o modificados genéticamente, en especial aquellos derivados de *N. meningitidis*, así como las Estructuras cocleares derivadas de éste, como nuevos adyuvantes inductores de CTL. Estos nuevos adyuvantes resultan de particular importancia contra infecciones fúngicas, virales, bacterianas y protozoarias (particularmente las intracelulares), así como enfermedades tumorales.

Por “Proteoliposoma” se entiende que estos son obtenidos de cepas bacterianas usando cualquier método conocido como puede ser: su aislamiento sin detergente; un proceso que incluya detergente (como desoxicolato) o la extracción a partir de vesículas “bleb” de sobrenadantes de cultivos y particularmente los revelados en US 5,597,572. Los Proteoliposomas contienen diferentes Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), estructuras moleculares conservadas entre patógenos capaces de estimular fuertemente al sistema inmunitario.

Por “Estructuras cocleares” se entiende un adyuvante derivado de los Proteoliposomas que por lo tanto también contienen PAMP según se refiere en la patente (Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. OCPI. 2002-0292 del 27/11/02).

Los mecanismos de protección contra *Neisseria*, bacteria Gram negativa extracelular, están relacionados con la inducción de anticuerpos que median fundamentalmente las funciones opsonofagocíticas y bactericidas. Por lo que, no es de esperar que los Proteoliposomas derivadas de ellas y la infección natural producida por esta bacteria, induzcan respuestas CTL.

5 Sin embargo, estudios de laboratorio han demostrado, sorpresivamente, que humanos inmunizados con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, vacuna anti-*N. meningitidis* B y C, muestran una respuesta con activación y proliferación de linfocitos tanto T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> específicos contra el Proteoliposoma, al ser evaluada en células mononucleares periféricas re-estimuladas *in vitro*.

10 También sorprendente ha sido encontrar que ratones Balb/c inmunizados con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, con Proteoliposomas o Estructuras cocleares inducen T CD8<sup>+</sup> específicos, además de los conocidos T CD4<sup>+</sup>.

De igual forma se ha encontrado, inesperadamente, que la infección por el microorganismo natural, *N. meningitidis* serogrupo B, induce respuesta tanto T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> anti-

15 Proteoliposoma, la cual fue detectada en linfocitos de individuos curados de enfermedad meningocócica causada por *N. meningitidis* B.

Fue inesperado que también los ratones inoculados con *N. meningitidis* B indujeran respuesta de células T CD8<sup>+</sup>.

Se ha encontrado, que tanto en células de inmunizados con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> como  
20 provenientes de individuos curados de enfermedad meningocócica, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y sorprendentemente los T CD8<sup>+</sup> secretan IFN $\gamma$  e IL2 y no IL4 ni IL5 al ser evaluados por Citometría de Flujo. Este resultado incluye a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> dentro de las células importantes en la producción de las citocinas características del patrón de respuesta Th1.

Todas estas evidencias fenotípicas y moleculares, apuntan hacia la inducción de una respuesta  
25 CTL luego de la infección natural o la inmunización con un Proteoliposoma proveniente de una bacteria extracelular, lo cual resulta extremadamente sorprendente.

Otras experiencias sorprendentes se obtuvieron a partir de la incorporación eficiente de antígenos exógenos como la Ovalbúmina (Ova) en el Proteoliposoma y sus derivados, aunque sus capacidades no se restringen a este antígeno. La incorporación de Ova en el  
30 Proteoliposoma indujo, en células dendríticas, presentación a nivel de MHC clase I y su reconocimiento y activación por hibridomas de células T CD8<sup>+</sup>. Estos resultados evidencian

la inducción de una respuesta CTL contra antígenos heterólogos que puede ser empleada para el desarrollo de nuevas preparaciones vacunales.

La inserción o conjugación de epitopes CTL provenientes de Ova fueron incorporados en los Proteoliposomas o sus derivados y de esta forma se incrementó la respuesta inducida contra estos epitopes.

También forman parte de la presente invención Proteoliposomas que pueden expresar altas concentraciones de antígenos de interés, mediante la manipulación por ingeniería genética de la cepa productora del Proteoliposoma con el fin de que exprese “más o menos” cantidad del o de los antígenos heterólogos deseados.

10 Por “antígenos de interés” se entiende aquellos provenientes de hongos, virus, bacterias, protozoos y cáncer que han demostrado requerir de respuesta CTL para su eficiente eliminación por el sistema inmune, sin restringirse a los ya identificados.

Por “más o menos” se entiende en particular que la cepa exprese más de un 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 ó 0.1% de la cantidad del o los antígenos heterólogos de interés. Preferiblemente la cepa ingenierizada expresa entre 0.5% y 10% del antígeno de interés.

El gen codificante del antígeno de interés de la invención puede ser ingenierizado según lo expresado anteriormente por técnicas conocidas.

También forma parte de la presente invención la obtención de diferentes formulaciones vacunales que aprovechan la capacidad de los Proteoliposomas y las Estructuras cocleares de inducir respuestas CTL, no descrita con anterioridad.

Antígenos tumor asociados, gangliósidos o proteínas provenientes de *Leishmania* fueron incluidos en los Proteoliposomas o en sus derivados y se demostró la inducción de respuesta CD8+ y producción de IFN $\gamma$  cuando ratones Balb/c fueron inmunizados y desafiados *in vitro* con los respectivos antígenos. También muestran ser efectivas formulaciones vacunales, donde los antígenos son conjugados a parte de los Proteoliposomas de la composición vacunal o una vez conjugados a éstos son transformados en Estructuras cocleares.

Las formulaciones vacunales de la presente invención pueden ser usadas para proteger un mamífero susceptible a la infección o tratar enfermedades tumorales por medio de la administración de dicha formulación vacunal por vía sistémica o mucosal. Estas aplicaciones pueden incluir inyecciones por rutas intramusculares, intraperitoneales, intradérmica o

subcutánea o administración mucosal por vía oral/alimentaria, nasal/respiratoria o tractus genitourinario.

La cantidad de Proteoliposoma o Estructuras cocleares en cada formulación es seleccionada como la cantidad que muestra función adyuvante, que siempre es inferior a la empleada en las vacunas anti-meningocócicas basadas en estas estructuras, por lo que los efectos secundarios adversos son inferiores y no son significativos. Esta cantidad variará en dependencia del antígeno de interés y como éste es incorporado. Generalmente la cantidad de Proteoliposoma o Estructuras cocleares en cada dosis estará entre 1 y 50 µg y más típicamente entre 5 y 25 µg. La cantidad del antígeno de interés estará en el rango de 0.1 a 20% de la masa de Proteoliposoma o Estructuras cocleares y preferiblemente 0.5 a 10%.

El número de dosis dependerá primariamente de si la formulación vacunal es profiláctica o terapéutica. En la primera, se aplicarán como máximo tres dosis y en la segunda se puede llegar hasta 5 dosis. Ambas pueden ser aplicadas en niños menores de un año, de 2 a 5 años, escolares, adolescentes, adultos y en la tercera edad.

La novedad de la invención radica primeramente, en el uso de Proteoliposomas o Estructuras cocleares derivados de proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y más particularmente de *N. meningitidis* B, como adyuvantes inductores de actividad CTL.

Es particularmente novedoso, que la infección natural con *N. meningitidis* B, bacteria extracelular, induzca respuesta de células T CD8<sup>+</sup>, linfocitos más asociados a la respuesta citotóxica y que estos produzcan IFNγ e IL2, evidenciando la inducción de actividad CTL, por lo que estos linfocitos también están potenciando la respuesta Th1 previamente demostrada.

Otro aspecto novedoso es su aplicación profiláctica en formulaciones vacunales fúngicas, virales, bacterianas o protozoarias y su aplicación terapéuticas en sujetos afectados con tumoraciones malignas en que se desea inducir una respuesta citotóxica.

Es particularmente novedoso además, la conjugación o inserción de epítopos citotóxicos a los Proteoliposomas o Estructuras cocleares, los que incrementan la respuesta CTL.

Es también novedoso, la posibilidad de empleo de estas formulaciones por vía mucosal además de por vía parenteral, o la combinación de estas vías.

Es también novedoso, la ingenierización de las cepas meningocócicas para producir Proteoliposomas o sus derivados que expresen antígenos citotóxicos.

De forma inesperada se obtiene respuesta CTL contra Proteoliposomas provenientes de bacterias extracelulares y sus derivados, las estructuras cocleares, cuando la inducción de actividad citotóxica sólo estaba circunscrita a gérmenes intracelulares, tumores o determinados adyuvantes que permitan una presentación cruzada (cross priming).

- 5 También fue inesperado el hallazgo de inducción de actividad CTL en convalecientes de enfermedad meningocócica o en portadores de *Neisseria*, germen extracelular que no debiera inducir actividad CTL.

Estas actividades se manifestaron por la inducción de linfocitos CD8+, por la presencia de IFN $\gamma$  e IL2 en ellos, la presentación de antígenos heterólogos en MHC clase I de células  
10 dendríticas y su reconocimiento y activación de hibridomas CD8+ y la lisis de células que expresan antígenos heterólogos.

Los Proteoliposomas y las Estructuras cocleares son obtenidos a escala industrial en condiciones de Buenas Prácticas de Producción (GMP, Good Manufacture Practices) en el Instituto Finlay y contamos con metodologías para la inclusión de antígenos heterólogos en  
15 los mismos.

La solución propuesta tiene las siguientes ventajas:

El efecto inmunológico logrado por este preparado permite inducir respuestas CTL por el Proteoliposoma y las Estructuras cocleares contra los antígenos heterólogos incorporados en estos, lo que es aplicable; pero no limitado, a microorganismos intracelulares y a  
20 enfermedades tumorales.

El efecto inmunológico de los Proteoliposomas como vacuna y transitivamente como adyuvante, donde se emplea menores cantidades, es seguro en niños menores de un año, de 2 a 4 años, en escolares, adolescentes y adultos.

Los Proteoliposomas y las Estructuras cocleares por la preferencial respuesta celular (Th1)  
25 inducida, también convierten a antígenos T-independientes (conjugados o incorporados no covalentemente), tales como carbohidratos en antígenos T-dependientes. Esta propiedad se aplica también de forma ventajosa a los antígenos de interés de carácter sacarídicos.

Es útil la flexibilidad de las Estructuras cocleares para incorporan antígenos particulados, especialmente ADN induciendo respuesta CTL contra ellos

30 La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplo 1. Obtención del Proteoliposoma. Para la obtención del Proteoliposoma se realiza un cultivo de *N. meningitidis* B o *Salmonella typhi* y la biomasa colectada mediante centrifugación se somete a un proceso de extracción con detergente, enzimas y ultrasonido. El debris celular es removido mediante centrifugación y el sobrenadante es sometido entonces a digestión con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos. El extracto es recuperado mediante ultracentrifugación, resuspendido en solución con detergente y purificado del resto de los componentes de bajo y mediano peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular. El Proteoliposoma así obtenido contiene menos del 10% de ácidos nucleicos y menos del 10% de LPS insertado en su estructura; pero nunca libres. El LPS presente es esencial en desencadenar las señales de peligro para iniciar la respuesta innata. El producto final es sometido a un conjunto de controles biológicos y físico-químicos.

Ejemplo 2. Respuesta de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> por inmunización de ratones. Ratones Balb/c fueron inmunizados con dos dosis de 25 µg cada una de Proteoliposoma o Estructuras cocleares, por vía intramuscular o nasal y espaciadas 14 días. Las células de bazo fueron tomadas a los 7 días de la segunda dosis y desafiadas por 4 días con Proteoliposoma. Las células expandidas fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti-CD8 y posteriormente con una anti-IgG fluorescente y fueron evaluados por Citometría de Flujo. La inmunización estimuló tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> anti-Proteoliposoma. 45% de los linfocitos fueron T CD4<sup>+</sup> y 40% fueron T CD8<sup>+</sup>.

Ejemplo 3. Respuesta de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> por inmunización de humanos. Adultos jóvenes fueron inmunizados con dos dosis de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> de 50 µg cada una por vía intramuscular, espaciadas 6 semanas. Siete días después de la segunda dosis se tomó sangre y se purificaron, sobre gradiente de Ficoll-Hipaque, las células mononucleares periféricas. Estas se enfrentaron por 4 días con Proteoliposoma. Las células expandidas fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti-CD8 y posteriormente con una anti-IgG fluorescente y fueron evaluados por Citometría de Flujo. La inmunización estimuló tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> anti-Proteoliposoma. 50% de los linfocitos fueron T CD4<sup>+</sup> y 42% fueron T CD8<sup>+</sup>.

Ejemplo 4. Respuesta de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en convalecientes de enfermedad meningocócica. Dos meses después del alta de pacientes que habían padecido enfermedad meningocócica causada por *Neisseria meningitidis* B se tomó sangre y se purificaron, sobre

gradiente de Ficoll-Hipaque, las células mononucleares periféricas. Estas se enfrentaron por 4 días con Proteoliposoma. Las células expandidas fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 o anti-CD8 y posteriormente con una anti IgG fluorescente y fueron evaluados por Citometría de Flujo. Se evidenció proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. 47% de los linfocitos fueron T CD4<sup>+</sup> y 39% fueron T CD8<sup>+</sup>.

Ejemplo 5. Señales de activación y producción de citocinas intracelulares por linfocitos de humanos inmunizados. Adultos jóvenes fueron inmunizados con dos dosis de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> de 50 µg cada una por vía intramuscular, espaciadas 6 semanas. Varios meses después de la segunda dosis se tomó sangre. Estas se enfrentaron por 27 horas con Proteoliposoma a una concentración de 10 ó 20 µg/ml. Posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados y el resto celular fue permeabilizado y enfrentado a anticuerpos monoclonales para la detección de citocinas intracelulares (IFN $\gamma$ , IL2 o IL5) y marcadores de membrana (CD4, CD8 y CD69). 3.28% de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y 20.65% de linfocitos T CD8<sup>+</sup> fueron activados con 10 µg/ml de Proteoliposoma, mientras que 3.86 % de T CD4<sup>+</sup> y 14.11% de T CD8<sup>+</sup> fueron activados con 20 µg/ml de Proteoliposoma. Sin embargo, sólo los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados produjeron IFN $\gamma$  e IL2, aunque en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados se detectó también cierta producción de IL2. Los porcentajes de IFN $\gamma$  intracelular en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> con 10 µg/ml fueron 0.35 y 0.89 y con 20 µg/ml fueron 1.54 y 1.29, respectivamente; pero sólo de las células productoras de IFN $\gamma$  estaban activadas el 0.57% con 10 µg/ml y el 0.87% con 20 µg/ml de los T CD8<sup>+</sup>. Los porcentajes de IL2 intracelular en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> con 10 µg/ml fueron 1.19 y 1.07 y con 20 µg/ml fueron 1.18 y 1.6, respectivamente; pero sólo las células productoras de IL2 estaban activadas el 0.68 y el 0.7% con 10 y 20 µg/ml, respectivamente de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> sólo bajos porcentajes de producción de IL2 en las células activadas se detectaron. No se observó producción de IL5 por ninguna de las subpoblaciones linfocitarias.

Ejemplo 6. Señales de activación y producción de citocinas intracelulares por linfocitos de convalecientes de enfermedad meningocócica. Dos meses después del alta de pacientes que habían padecido la enfermedad meningocócica causada por *Neisseria meningitidis* B se tomó sangre. Estas se enfrentaron por 27 horas con Proteoliposoma 10 µg/ml. Posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados y el resto celular fue permeabilizado y enfrentado a anticuerpos monoclonales para la detección de citocinas intracelulares (IFN $\gamma$ , IL2 o IL5) y marcadores de

membrana (CD4, CD8 y CD69). Los porcentajes de T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> activados fueron 9.29 y 26.81, respectivamente. Ambos subset de linfocitos, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, activados produjeron IFN $\gamma$  y solo los linfocitos T CD8<sup>+</sup> produjeron IL2. Los porcentajes de IFN $\gamma$  intracelular fueron en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de 3.46 y 1.36, respectivamente; pero de éstos solo eran células activadas el 0,65 y el 0.95%, respectivamente. Los porcentajes de IL2 intracelular fueron en los T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de 0.73 y 0.93, respectivamente; pero de éstos solo eran células activadas el 0.27 y el 0.73%, respectivamente. No se observó producción de IL5.

Ejemplo 7. Incorporación de antígenos exógenos en el Proteoliposoma. Ovalbúmina (Ova) fue incorporada en el Proteoliposoma mediante el empleo de detergentes, particularmente desoxicolato, el cual permitió el desensamblaje de su estructura Proteoliposomal. La eliminación del detergente y el re-ensamblaje de la estructura en presencia de Ova permitieron su incorporación en el Proteoliposoma. La proporción final de Proteoliposoma:Ova fue de 100:11.2. La estructura vesicular fue comprobada mediante cromatografía de exclusión molecular rindiendo perfiles similares del Proteoliposoma sólo y el del que contenía la Ova. La presencia de Ova fue comprobada por la técnica SDS-PAGE y su posterior Western Blot revelado con un anticuerpo policlonal anti-Ova el cual demostró la presencia de una banda correspondiente a Ova dentro del perfil proteico del Proteoliposoma.

Ejemplo 8. Incorporación de antígenos exógenos en Estructuras cocleares. La incorporación de proteínas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* fue eficientemente realizada mediante la inclusión de estas en la solución durante el proceso de formación de las Estructuras cocleares. La inmunización de animales con las Estructuras cocleares conteniendo estos antígenos demostró el incremento de la respuesta anti-*Leishmania*, así como la reducción de las induraciones producidas por la infección con este protozoo. La presencia de esta proteína también fue evidenciada por la técnica SDS-PAGE seguido de un Western Blot revelado con anticuerpos anti *Leishmania*.

Ejemplo 9. Conjugación de antígenos a los Proteoliposomas. Este es descrito en el ejemplo 1.2 de la patente "Método de obtención de vacunas conjugadas. Composiciones vacunales" Patente OCPI 2002-0257 de 14/11/02.

Ejemplo 10. Incorporación de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos. Lipopolisacáridos (LPS) de *Neisseria meningitidis* B han sido incorporado en diferentes

cantidades, incrementando las concentraciones de éste presentes normalmente en los Proteoliposomas hasta un 12% con un incremento en la respuesta inmune obtenida. También se han incorporado LPS de *Vibrio cholerae* lo que ha permitido inducir respuesta anti-LPS de *Vibrio*.

- 5 Ejemplo 11. Producción de IFN $\gamma$  por linfocitos T CD8 $^{+}$  contra antígenos heterólogos incorporados o conjugados en Proteoliposomas y Estructuras cocleares. Células de bazo de animales inmunizados con Proteoliposomas conteniendo Ova o proteínas de *Leishmania* en Estructuras cocleares indujeron respuesta T CD8 $^{+}$  y estos expresaron IFN $\gamma$  al ser evaluados por la técnica de ELISPOT T. Los conjugados de Polisacárido C a Proteoliposomas indujeron  
10 respuesta de IFN $\gamma$  al ser evaluados por ELISA.

- Ejemplo 12. Incorporación de ADN plasmídico en las Estructuras cocleares y liberación de este en el citoplasma celular. El plásmido pGFP, que contiene el gen de la proteína verde fluorescente bajo un promotor de expresión en células superiores (CMVp), fue eficientemente incorporado en Estructuras cocleares. Las Estructuras cocleares conteniendo dicho plásmido  
15 fueron adicionado a un cultivo de células de la línea L929. La expresión de la proteína verde fluorescente en el citoplasma celular fue comprobada mediante microscopia óptica de fluorescencia.

- Ejemplo 13. Células Dendríticas expuestas al Proteoliposoma (PL) conteniendo Ovalbúmina (Ova) pueden presentar péptidos de Ova a células T. Fueron empleados hibridomas de células  
20 T CD4 $^{+}$  (OT4H) restringidas para MHC clase II y de células T CD8 $^{+}$  (CD8OVA) restringidas para MHC clase I específicos para los péptidos de Ova (257-264) y (265-277), respectivamente. Células Dendríticas (CD) fueron incubadas por 2 h con PL-Ova o Ova soluble y luego co-cultivadas con los hibridomas de células T. Los sobrenadantes fueron colectados luego de 24 h y testados para detectar producción de IL2 a través de la incorporación de [ $^3$ H]  
25 timidina por la línea celular CTLL dependiente de IL2. La producción de IL2 brinda una medida de la activación de los hibridomas de células T específicos para péptidos de Ova. La Figura 1 muestra que las CD incubadas con PL-Ova pueden presentar los péptidos de Ova al hibridoma de células T CD4 $^{+}$  y al de T CD8 $^{+}$ . Los hibridomas de células T produjeron niveles de IL2 significativamente mayores cuando fueron estimulados con CD que habían  
30 sido previamente incubadas con PL-Ova en comparación con CD incubadas sólo con Ova. Las diferencias significativas entre los niveles de presentación de los péptidos específicos de

Ova en MHC-I y MHC-II por CD incubadas con PL(Ova) o Ova fueron determinados usando la Prueba de comparación múltiple de Duncan. De esta forma, el Proteoliposoma puede liberar antígenos a CD y propiciar una eficiente presentación antigénica a células T.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Figura 1. Células dendríticas pueden procesar péptidos de Ova incluidos en el Proteoliposoma (PL-Ova) y presentarlos en MHC-I y MHC-II DC. Fig. 1A muestra la respuesta del hibridoma de células T OT4H a CD de ratones C57BL/6 co-incubadas con el Proteoliposoma (PL), Ova o PL-Ova; Fig. 1B muestra la respuesta del hibridoma de células T OvaCD8<sup>+</sup>. La producción de IL-2 por los hibridomas fue cuantificada por incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina por la línea celular CTLL dependiente de IL-2. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DS de tres experimentos diferentes. CPM, centelleo por minuto.

\*significativamente diferente de otros grupos.

15

20

25

5

## REIVINDICACIONES

1. Adyuvantes vacunales caracterizados por ser un Proteoliposoma o derivados de este que inducen respuesta CTL.
- 10 2. Adyuvantes vacunales según reivindicación 1, caracterizados porque el Proteoliposoma o sus derivados son de origen bacteriano.
3. Adyuvantes vacunales según reivindicación 2, caracterizados porque provienen del género *Neisseria* o *Salmonella*.
- 15 4. Adyuvantes vacunales según reivindicación 1, caracterizados porque el Proteoliposoma o sus derivados expresan antígenos heterólogos de interés a partir de una cepa modificada genéticamente.
5. Formulación vacunal caracterizada porque comprende el o los adyuvantes según las reivindicaciones de la 1 a la 4, uno o más antígenos, así como excipientes adecuados.
- 20 6. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el antígeno(s) es insertado en la bicapa lipídica de los Proteoliposomas, estando así presente en sus derivados.
7. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el antígeno(s) es conjugado al Proteoliposoma, estando así presente en sus derivados.
8. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el antígeno(s) es co-administrado con el Proteoliposoma o sus derivados.
- 25 9. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el antígeno(s) se puede seleccionar del grupo de antígenos provenientes de hongos, virus, bacterias, protozoos y cáncer y que han demostrado requerir de respuesta CTL para su eficiente eliminación por el sistema inmune.

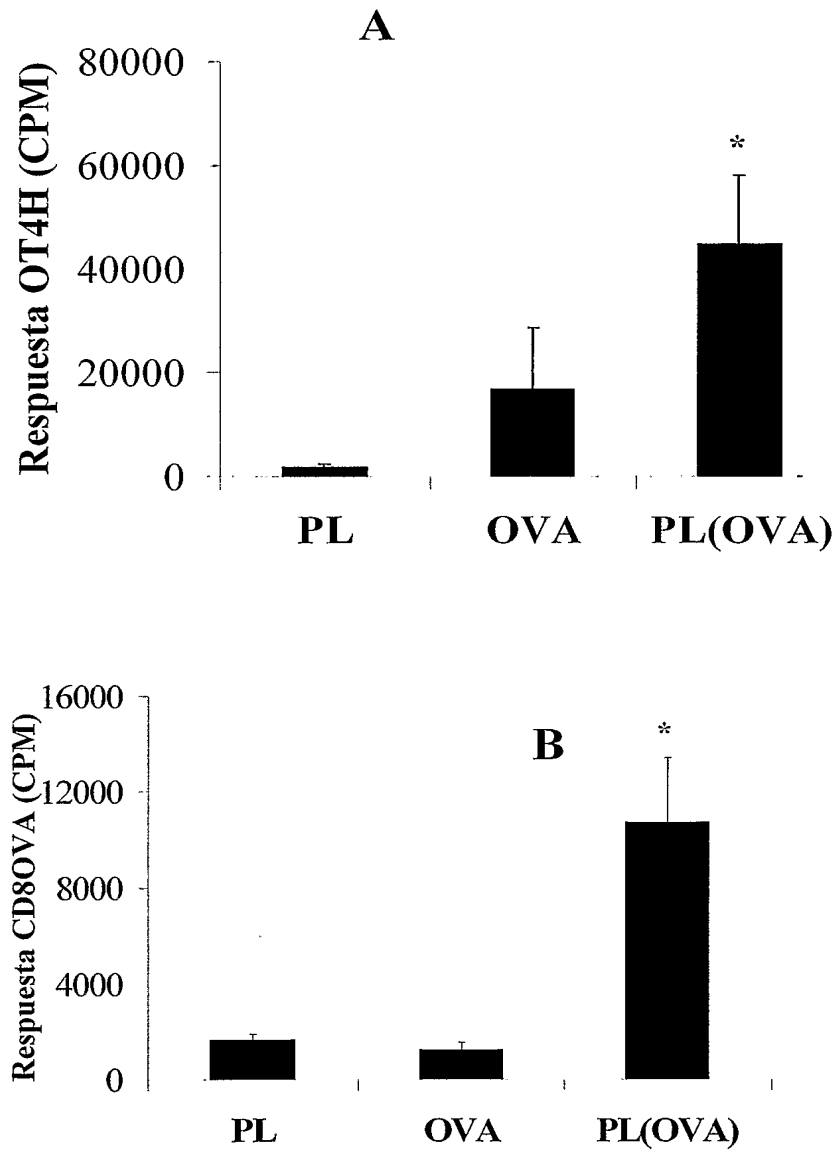
10. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el Proteoliposoma o sus derivados se encuentran en un rango entre 1 y 50  $\mu\text{g}$  y particularmente entre 5 y 25  $\mu\text{g}$ .
- 5 11. Formulación vacunal según reivindicación 5, caracterizado porque el o los antígenos se encuentran en un rango entre 0.1 a 20% de la masa de Proteoliposoma o sus derivados y particularmente entre 0.5 a 10%.
- 10 12. Formulación vacunal según reivindicaciones de la 5 a la 11, caracterizado porque la vía de administración puede seleccionarse del grupo de intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o vía mucosal por oral/alimentaria, nasal o tractos genitourinario.
13. Uso de la formulación vacunal según reivindicaciones de la 5 a la 11 para la protección de mamíferos susceptibles a infecciones y para el tratamiento de enfermedades tumorales.
- 15 14. Esquema de inmunización empleando las formulaciones según reivindicaciones de la 5 a la 11, caracterizado porque para lograr un efecto profiláctico se aplicarán como máximo tres dosis y para lograr un efecto terapéutico se aplicarán como máximo cinco dosis.

20

25

Fig. 1

5



10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2004/000017

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC <sup>7</sup> A61K 39/39 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>7</sup> A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS. MEDLINE				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 03094964 A (INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS, CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS) 20.11.2003 Page 8, line 20 - page 9, line 19; page 10, lines 18-23	1-3, 5, 7, 8, 11, 14		
X	WO 02072012 A (INTELLIVAX INTERNATIONAL, INC) 19.09.2002 Pages 3, line 20 - page 4, line 18; page 5, lines 7-12	1-3, 5, 8, 9, 12, 13		
X	US 5597572 A (HUERGO ET AL.) 28.01.1997 Column 3, line 47 - column 4, line 5	1-3, 5, 7, 13		
A	GB 2282379 A (MERCK & CO INC) 05.04.1995 Claims 1, 3, 7	1-3, 5		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search (07.03.2005)		Date of mailing of the international search report <b>22.03.2005</b>		
Name and mailing address of the ISA/ <b>S.P.T.O.</b>		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ CU 2004/000017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03094964 A1	20.11.2003	AU 2003229258 A1	11.11.2003
WO 02072012 A2	19.09.2002	CA 2438425 A1	19.09.2002
		US 2003044425 A1	06.03.2003
		EP 1372706 A2	02.01.2004
		EP 20020713807	11.03.2002
		JP 2004521925 T	22.07.2004
US 5597572 A	28.01.1997	EP 0301992 A2	01.02.1989
		EP 19880500077	30.07.1988
		JP 1125328 A	17.05.1989
		AU 2031288 A	25.05.1989
		IN 167607 A1	24.11.1990
		AU 615461 B2	03.10.1991
		AU 8134991 A	31.10.1991
		AU 5319794 A	24.03.1994
		RU 2023448 C1	30.11.1994
		AT 122893 T	15.06.1995
		DE 3853854 D	29.06.1995
		ES 2074445 T	16.09.1995
		GR 3017218 T	30.11.1995
		DE 3853854 T	08.02.1996
		AU 7422696 A	20.02.1997
		US 5747653 A	05.05.1998
		AU 706213 B2	10.06.1999
		CA 1341199 C	06.03.2001
GB2282379 A	05.04.1995	NONE	

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2004/000017

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> A61K 39/39

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS. MEDLINE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 03094964 A (INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS, CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS) 20.11.2003 Pág. 8, línea 20 - pag. 9, línea 19; pag. 10, líneas 18-23	1-3, 5, 7, 8, 11, 14
X	WO 02072012 A (INTELLIVAX INTERNATIONAL, INC) 19.09.2002 Pág. 3, línea 20- pag. 4, línea 18; pag. 5, líneas 7-12	1-3, 5, 8, 9, 12, 13
X	US 5597572 A (HUERGO ET AL.) 28.01.1997 Columna 3, línea 47 - columna 4, línea 5	1-3, 5, 7, 13
A	GB 2282379 A (MERCK & CO INC) 05.04.1995 Reivindicaciones 1, 3, 7	1-3, 5

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

07 Marzo 2005 (07.03.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

22.03.2005 22 MAR 2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Collados Martín Posadillo

N° de teléfono + 34 91 3495552

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2004/000017

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03094964 A1	20.11.2003	AU 2003229258 A1	11.11.2003
WO 02072012 A2	19.09.2002	CA 2438425 A1	19.09.2002
		US 2003044425 A1	06.03.2003
		EP 1372706 A2	02.01.2004
		EP 20020713807	11.03.2002
		JP 2004521925 T	22.07.2004
US 5597572 A	28.01.1997	EP 0301992 A2	01.02.1989
		EP 19880500077	30.07.1988
		JP 1125328 A	17.05.1989
		AU 2031288 A	25.05.1989
		IN 167607 A1	24.11.1990
		AU 615461 B2	03.10.1991
		AU 8134991 A	31.10.1991
		AU 5319794 A	24.03.1994
		RU 2023448 C1	30.11.1994
		AT 122893 T	15.06.1995
		DE 3853854 D	29.06.1995
		ES 2074445 T	16.09.1995
		GR 3017218 T	30.11.1995
		DE 3853854 T	08.02.1996
		AU 7422696 A	20.02.1997
		US 5747653 A	05.05.1998
		AU 706213 B2	10.06.1999
		CA 1341199 C	06.03.2001
GB2282379 A	05.04.1995	NINGUNO	-----